ATTO Technical Manual

２次元電気泳動のコツ

「コンパクト／ミニアガロースゲル２次元電気泳動」

ATTO Corporation

3-2-2 Motoasakusa Taitou-ku Tokyo 〒111-0041
TEL 03-5827-4861　FAX 03-5827-6647
URL http://www.atto.co.jp

ATTO Corporation (Osaka)

2-8-1 Higashi-Temman Kita-ku Osaka City
〒530-0044
TEL 06-6136-1421　FAX 06-6356-3625

はじめに

タンパク質の分離・分析には、電気泳動はかかせない方法です。一口に電気泳動と言っても多くの種類（方法）がありますが、プロテオームブームで近年再認識されている２次元電気泳動について注目したいと思います。２次元電気泳動の特長は**高分離能**にあります。これによりタンパク質の網羅的解析を目的として利用されるようになりました。しかし２回電気泳動を行なうというやや煩雑で時間のかかる操作のため、２次元電気泳動は「大変そう」というイメージがあります。そこで、ここでは「**速く、小さく、安く、簡単に**」のコンパクト/ミニサイズのアガロース２次元電気泳動についてご紹介しながら、実験上のコツなどをまとめています。尚、ここでの２次元電気泳動は１次元目にアガロース等電点電気泳動、２次元目にSDS-PAGEを行なう方法について記載しています。

２Ｄコンパクトシステム

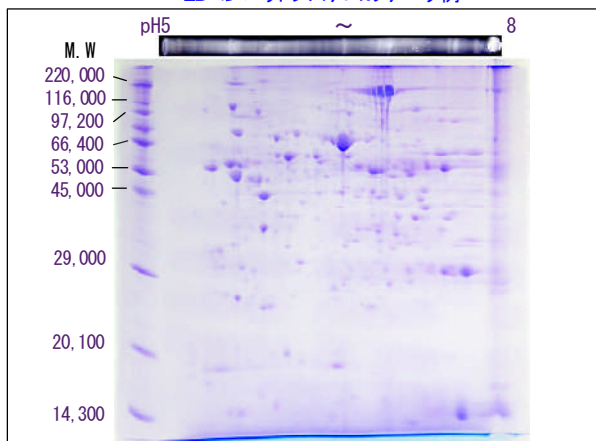
２Ｄミニスラブシステム

目指す結果は？

２次元電気泳動のパターンの理想のポイントは
- ●スポット同士がきれいに分離されている
- ●再現性がある
- ●バックが低く（高S/N）均一である
- ●正確な結果が得られる　　　　　　　　などです。

これらの条件を満たすためには、使用する装置の機能、実験の操作上のコツなどが重要です。実際にきれいなパターン、正しい結果を出すためにはどのようにすればいいのか？をまとめたのがこの資料です。

尚、アトーの「２Ｄコンパクト／ミニシステム（アガロースゲル２次元電気泳動）」は、１次元目のゲルにアガロースゲルを用いることで、サンプル量を多くアプライ出来る、高分子量（転写因子、膜タンパク質など）のサンプルも分離可能、という特長もあります。泳動装置・周辺機器の操作性も良く、短時間（１日）で結果が得られるメリットと合わせて、理想の２次元電気泳動を目指して是非ご利用ください。

2Dコンパクトシステムのデータ例

試料：ラット肝臓抽出物　1次元目ゲル：pH5～8アガーゲル
検出：クマシー染色　2次元目ゲル：12.5%パジェル・コンパクト

実験の流れ

「１日で終る２次元電気泳動！」ということで、アトーオリジナルの２Ｄコンパクト／ミニスラブシステム（アガロースゲル２次元電気泳動）について実験方法を解説します。（製品についてはカタログをご参照ください）

「実験の流れと注意項目」の図では各ステップのポイント（要点、注意点、コツなど）を書き出しました。

以降のページではそれぞれのステップについて手順や注意すべき点などの詳細を説明していきたいと思います。　尚、各溶液組成や操作は取扱説明書をご参考ください。

実験の流れと注意項目

試料の調製
- ●界面活性剤は両イオン性のCHAPSや非イオン性のTritonX-100を使用
- ●還元剤はDTTを使用(メルカプトエタノールは還元力が弱い)
- ●プロテアーゼインヒビターでタンパク質の分解を防止
- ●チオール基を修飾(ジスルフィド結合の再構築を防ぐ)
- ●沈殿物、浮遊物は除去

一次元目電気泳動（アガロースIEF）
- ●既製ゲルがお勧め
- ●ゲルを作製する場合は丁寧に
- ●サンプル溶液のボリュームはなるべく少量で
- ●電極液、＋－を間違えないように
- ●定電圧300Vで150～210分通電

固定・洗浄・前処理
- ●泳動カラムからゲルを出す(アガロースゲルは容易)
- ●固定液に浸けてタンパク質の拡散を防止（バンドが白く確認出来る）
- ●純水で十分洗浄（アンフォライトを抜く）
- ●SDS平衡化液に浸ける(SDSの結合)

二次元目電気泳動（SDS－PAGE）
- ●既製ゲルがお勧め
- ●2次元目ゲルへはしっかり密着
- ●分子量マーカー（溶液)をろ紙にしみ込ませて添加
- ●アガロースで2次元目ゲルに固定
- ●定電流20～40mAで約90分通電

染色・検出
- ●固定液⇒クマシー染色液・銀染色　バックグランドが低く短時間で検出可能
- ●振とうしながら染色・脱色
- ●アンフォライトが抜けていないと高バックの原因に

撮影・解析
- ●ゲル撮影解析装置を使用
- ●パターンの比較
- ●解析データを保存

トラブルシューティング

データ

試料の調製

●サンプル溶解液の調製

最適なサンプル溶解液の組成はサンプルによって異なり、文献で多数報告されています。ここでは完全溶解・変性を目指し下記組成を提示しています。（詳細は取扱説明書参照）下記を参考にサンプルに応じて組成を工夫されることをおすすめします。グレードは高いものを選びましょう。

・サンプル溶解液

トリス、尿素※1、チオ尿素※1、コンプリート ミニEDTA-free※2 CHAPS※3、Triton X-100※3、

以上を蒸留水に溶解し塩酸でpH8.8～9.0※4に調整し、

サンプル調製直前にDTT※5を溶解

※1 尿素、チオ尿素は弱い変性剤で、（特に膜タンパク質の）溶解度を上げる効 果があると言われています。

※2 コンプリートミニEDTA-free はプロテアーゼインヒビター（タンパク質抗分解剤） です。ロシュダイアグノスティクス社。EDTAは自身に荷電があるので含まれ ていないものを使用します。

※3 CHAPSは両イオン性界面活性剤、TritonX-100は非イオン性界面活性剤で、疎水性タンパク質の溶解度を上げます。

※4 pH8.8～9.0はチオール基の還元・修飾（※9参照）に重要です。

※5 DTTは還元剤でジスルフィド結合（-S-S-）を切断します。メルカプトエタノールは還元力が弱いため使用しません。尚、DTTを加えたサンプル溶解液は－20℃で保存し1週間以内に使用してください。

※ トリス、尿素、チオ尿素、コンプリートミニEDTA-free、CHAPS、TritonX-100を溶解・混合しpHを調整した溶液を小分けして－20℃で保存しておき、使用時に DTTを加えるようにすると長期保存が可能で便利です。

●サンプルの調製

①サンプルとなる組織片や細胞の湿重量の５～20倍容量のサンプル溶解液を加え、4～10℃でホモジェナイザーなどを用いてサンプルを十分に溶解します。

サンプルが溶液の場合はサンプル量がサンプル溶解液の1/10量を超えないようにします。

塩濃度が高い（およそ50mM以上）場合は脱塩しておきます。泳動を乱す原因となります。

②サンプル溶解液を50,000rpm・4℃・20分の超遠心分離※6にかけます。

③上清を回収します。液面に脂肪の層がある場合には、脂肪を吸い取らずに上清を回収します。※7

④必要に応じてタンパク質濃度を測定します。※8

⑤サンプル溶解液の1/10量の1Mアクリルアミド溶液または1Mヨードアセトアミド溶液を同様に加え混合します。チオール基（-SH）が修飾されジスルフィド結合の再構築を防ぎます。※9

※６ 一般的な遠心分離機では15,000rpm・4℃・30～60分で行いますが、より良い結果を得るためには超遠心をお勧めします。遠心分離が不十分だと、ゲルに不溶成分が詰まりパターンが乱れることがあります。

※７ 脂肪が混入すると、ゲルに詰まりパターンがひどく乱れる原因になります。

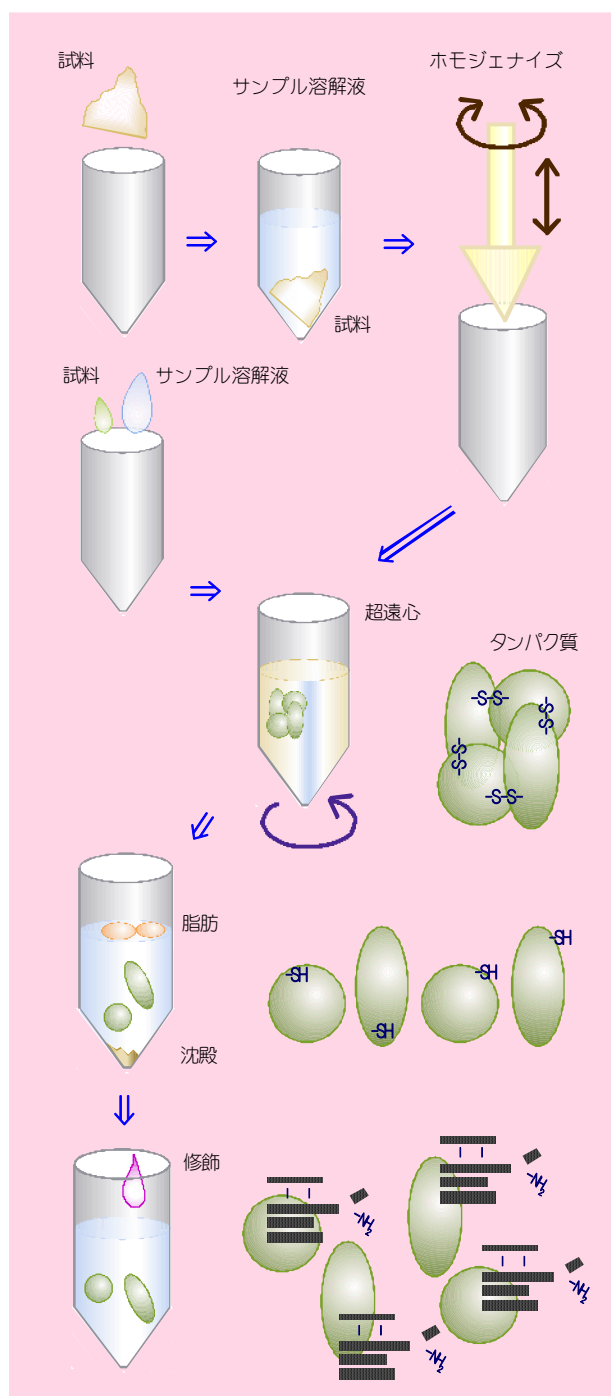
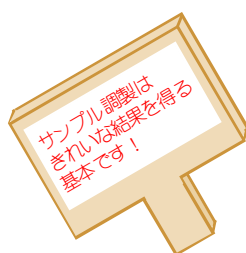
※８ ゲルへの添加量は［電気泳動］の項を参照ください。

微量のタンパク質定量方法・キットは各種ありますが、サンプル溶解液の組成および濃度によっては使用できないので予め確認して ください。使用例：「2-D Quant Kit」（アマシャムバイオサイエンス社）

※９ ＤＴＴにより還元されたチオール基（-SH）が、泳動中に再酸化されジスルフィド結合（-S-S-）を再構築するのを防ぐために、チオール基 を修飾し安定化させます。チオール基をアクリルアミドにより修飾 するこの反応は*Michael*反応または*Michael*付加と呼ばれます。泳動中 のタンパク質内・タンパク質間のジスルフィド結合の再構築は、ホモ オリゴマーやヘテロオリゴマースポットの出現の原因となります。 また、2次元パターン上の著しい縦すじ・横すじ（ストリーキング）と して現れることもあります。（次頁参照）

※ タンパク質を溶解したサンプル溶解液は－80℃に凍結保存し、2週間以内に使用し てください。

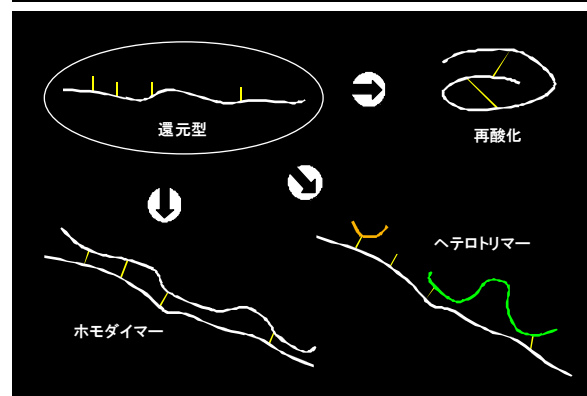
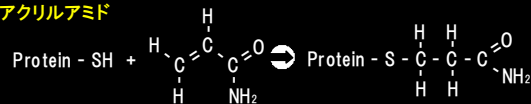
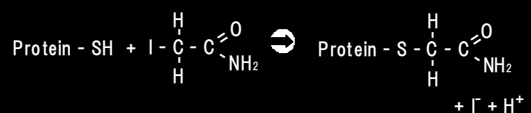
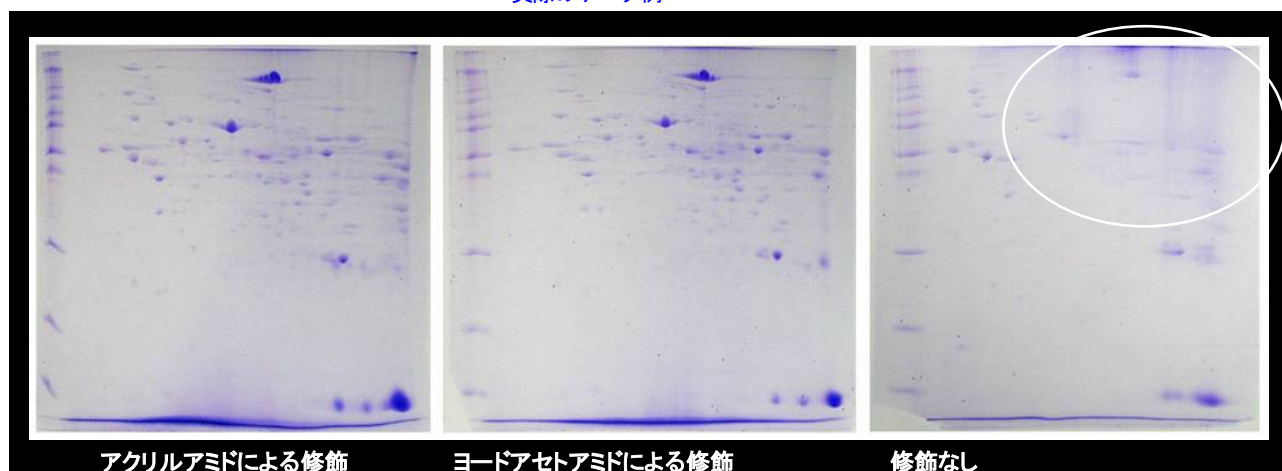
「EzApply2DKit」
価格20,000円

※二次元電気泳動用
試料抽出・調製キット。

●ジスルフィド結合の影響

タンパク質の構成成分であるアミノ酸の中で、システインなどに存在するチオール基（-ＳＨ）は通常ジスルフィド（−Ｓ−Ｓ−）結合を形成し安定状態にあります。

このジスルフィド（−Ｓ−Ｓ−）結合を還元剤で切っても泳動中に一部再構築（結合）してしまうことがわかっています。再構築は間違った泳動結果を生み出す原因になってしまいます。例えば、他のチオール基を持つタンパク質・ペプチドと結合しホモオリゴマーやヘテロオリゴマースポットの出現の原因となったり、２次元パターン上の著しい縦すじ・横すじとして現れることもあります。コンプレックスとして巨大化し、泳動時のゲルへの詰まりの原因となることもあります。

アトー（ディスクランおよびアガーゲルのプロトコール）では、この再構築を防ぐためにチオール基（-ＳＨ）のアクリルアミドまたはヨードアセトアミドによる修飾法を紹介しています。チオール基をアクリルアミドにより修飾するこの反応は、*Michael*反応または*Michael*付加と呼ばれています。

当然質量は増えますが、質量分析（ＭＳ）を行なう場合には、どのような修飾をしたかプログラムソフトに入力すると自動的にその分を引いて計算をしてくれます。

実際のデータ例

使用装置：ATTOコンパクト２Ｄシステム

ゲルの作製 １次元目（等電点電気泳動）

●アガロースゲル溶液の調製

①泳動カラム※10を十分洗浄して乾かしておきます。
②試薬を秤量しておきます。（詳細は取扱説明書参照）
・Ａ液　　アガロース IEF、ソルビトール、蒸留水
・試薬Ｂ　尿素、チオ尿素
・ファルマライト★（希望のpHレンジのもの）
③密閉フタ付きの透明な容器（例えば25/50mLコニカルチューブ）に、Ａ液に必要な各試薬、蒸留水を量り取り、軽く混合し均一にします。
④Ａ液を100℃の湯せん※11にて約20分間加熱して完全に溶解します。細かい粒・結晶が完全に見えなくなるのが目安です。
⑤Ａ液の溶解後すばやく試薬Ｂを加え、混合し完全に溶解します。
⑥溶解後ファルマライト を軽く混合しながら加え、均一に混合します。気泡のある場合はしばらく放置して完全になくします。（チオ尿素が入っているので室温では固まりません。）
これを1次元目アガロースゲル溶液とします。

●泳動カラムの準備

⑦手袋※12を着用します。よく洗浄し乾かした泳動カラムにゲル作製用印をつけます。泳動カラムの片端から50mm（コンパクトサイズの場合）又は75mmの位置（ミニサイズの場合）に油性マジックで線を引きます。
⑧ゲル作製用印から遠い方の泳動カラム片端に透析膜で底を形成し、ゲル作製台（上部槽）にセットします。

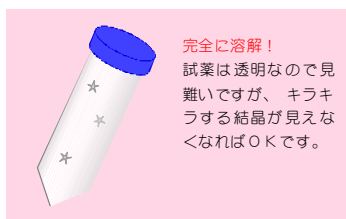
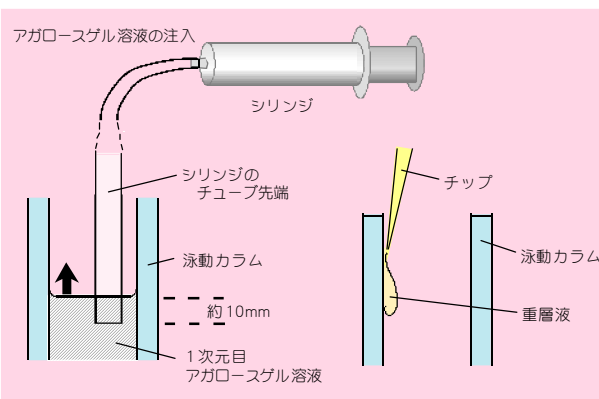
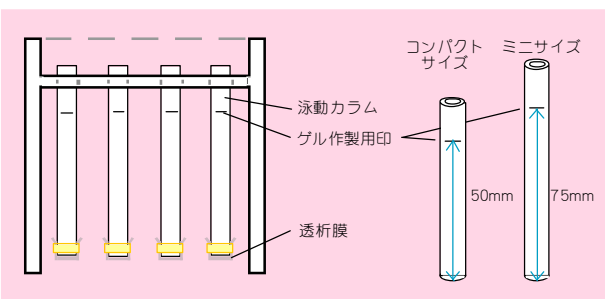
●アガロースゲル溶液の注入～固化

⑨1次元目アガロースゲル溶液をゲル作製シリンジに充填し、泳動カラム内に注入します。シリンジの先のチューブ先端を泳動カラムの下端まで※13差し込み、液面が上昇するに従ってチューブも上げながら注入します。
ゲル作製用印まで入れます。（気泡が残ってしまった場合は、カラムを指で弾くように軽くたたくと気泡がゆっくり上ってきます。）わずかな気泡も無いようにします。
⑩注入の終わった1次元目アガロースゲル溶液の上に**重層液**を50μＬのせます。細いチップを用いて泳動カラム内壁を伝わせてゆっくり※13と重層します。
⑪１次元目泳動槽にラップをかぶせ、５～10℃の水平な場所に静置し６時間から一晩かけて固化させます。（チオ尿素が入っているので室温では固まりません。）
固化後すぐに泳動に使用しない場合は、ゲル作製台から外して乾燥しないよう密封し、５～10℃で保存します。３～4ヶ月保存可能です。

※既製ゲル「アガーゲル」もあります。
袋から出してすぐに使用できます。
ドライストリップのような膨潤は不要です。

「アガーゲル」
価格9000円（コンパクト用10本入）
価格9500円（ミニゲル用10本入）

※試薬の不均一や温度下降によるムラ、気泡等は、ゲルの不出来＝泳動パターンのゆがみの原因となります。ゲルの良し悪しが泳動結果の良し悪しに大きく影響します。
★ファルマライト（両性単体）は通電することでｐＨ勾配が作製されます。

※10泳動カラムは十分に洗浄し乾燥させておきます。汚れや水滴は パターンのゆがみの原因となります。
※11泳動パターンが乱れることがあるので電子レンジは使用しないでください。

※12泳動カラム、透析膜、シリンジ、チューブ、チップ先端等には素手で触らないでください。微量なタンパク質（ケラチン等）も疑似スポットの原因になります。

※13泳動カラム下端までアガロース溶液チューブ先端を入れなったり、重層液を速く入れると空気が入って溶液が詰まってしまいます。

電気泳動 1次元目（等電点電気泳動）

●泳動準備・サンプルの添加

①泳動槽下部槽に下部電極液※14を注ぎます。

②泳動カラムを軽く振ってゲル上の重層液を排出します。③泳動カラムを上部槽に装着します。上部槽の使用しない穴はシリコン栓で閉じます。

④上部槽を下部槽内に入れ、 サンプル溶液を1次元目アガロースゲル上端に適当量※15アプライします。細いチップを用いて、泳動カラム内壁を伝わせてゆっくりと重層します。

2次元泳動後の染色がCBB染色の場合

コンパクトサイズ(ゲル長50mm)で100μg、

ミニサイズ(ゲル長75mm)で200μg

2次元泳動後の染色が銀染色の場合

コンパクトサイズ(ゲル長50mm)で1～2μg、

ミニサイズ(ゲル長75mm)で2～4μg

のトータルタンパク質量が目安です。

⑤重層液※16 10μLを同様にゆっくり重層し、さらに上部電極液を泳動カラム上端まで入れます。

⑥上部槽に上部電極液※14を静かに注ぎます。泳動カラムにあたらないよう、端から静かに入れます。

⑦酸性側電極液が「＋」(陽極)※14になるよう、塩基性側電極液が「－」(陰極)※14になるよう、電極端子と電源(部)を接続します。

●通電（泳動）

⑧一定電圧３００V※17で、

コンパクトサイズ(ゲル長50mm)で150分、

ミニサイズ(ゲル長75mm)で210分※17通電します。

尚、電源装置と接続して使用する場合は低電流出力が可能な電源を選択ください。１mA前後しか電流は流れません。

サンプル添加量目安

検出法	コンパクトサイズ（ゲル長50mm）	ミニサイズ（ゲル長75mm）
CBB染色の場合	100μg	200μg
銀染色の場合	1～2μg	2～4μg

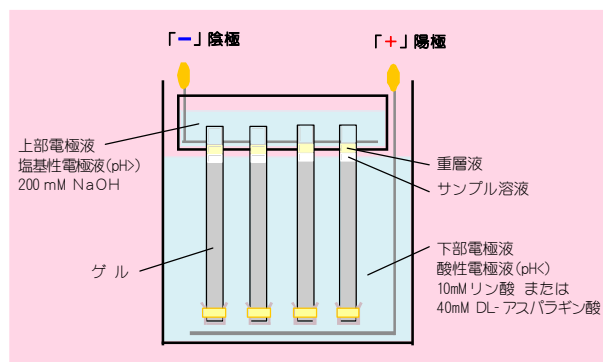
※15アプライ量は最大50μLですが、なるべく少ないほうが好ましいです。

※電源一体型泳動装置「ディスクラン-R」が便利です。

「ディスクラン-R」
(ゲル自作用/既製ゲル用)

●マーカー

２次元マーカー、等電点電気泳動用マーカー、分子量マーカー等を１次元目から使用する場合には、**変性系(尿素入り)でも使用可能なもの**を購入してください。本仕様ではゲル中に尿素を含むため、未変性系(native)用のマーカーを使用すると正しい結果を保証できません。有色マーカーを利用すると泳動されていくのが確認できて便利ですが、上記条件に注意してください。

例)バイオラッド社 2-Dスタンダード(２次元用マーカー)

※14上部電極液＝塩基性電極液(pH>)＝200mMNaOH←陰極「－」
下部電極液＝酸性電極液(pH<)＝10mMリン酸
または40mMDL-アスパラギン酸←陽極「＋」
L-アスパラギン酸は溶解度が低い為使用しないでください。
サンプルによっては上下(＋－)を逆にする場合もあります。
pH範囲にかかわらず上記電極液を用います。

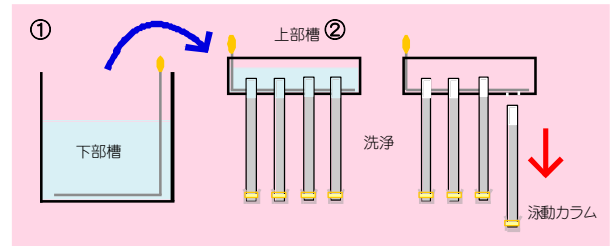
※16サンプルに電極液が直接接することにより起こるサンプルの沈殿を防ぐ為のものです。終濃度0.01%程度になるようBPBを加えると通電が(BPBが陽極に向かってゲル内を移動するのが)確認出来ます。

※17アガロースゲルではO'Farrellの様に序々に電圧を上げる必要はありません。通電時間を延長してもバンドのシャープさ(バンドの収束)はほとんど変わりません。かえってpH勾配のドリフト等をおこしますので時間を守ってください。
長時間泳動(overnight)する場合は電圧を下げます。Vhr値(電圧×時間)を同じにします。(例300Vx210min＝70Vx900min[15hr])

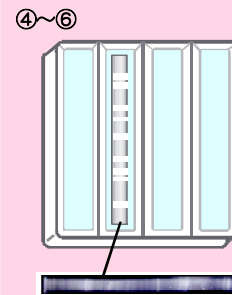
固定・洗浄・前処理

①泳動終了後､下部槽から上部槽を取り出し､上部電極液を廃棄し､蒸留水で上部･下部両電極液を洗い流します。
②泳動カラムを泳動パッキンから抜き取り､ゲルが飛び出さないように泳動カラムを<u>水平にして</u>透析膜を取り外します。傾けるとゲルが落ちることがあります。
③固定液※18を入れたトレイの上で、泳動カラムを傾けるとゲルが滑り落ちてきます。固定液中にゆっくりと沈めておだやかに３分間振とうします。
④固定液を破棄後、蒸留水を入れ洗浄します。新しい蒸留水を入れ換えて、同様に約１分間の洗浄を合計３回行います。
⑤再度新しい蒸留水に交換し、<u>２時間</u>おだやかに振とうします。※19
⑤' <u>(保存)</u>すぐに２次元目の泳動をしない場合はこの段階で保存しておきます。※20
⑥２次元目の泳動の準備が出来次第、蒸留水を捨て、SDS平衡化液※21を 100mL を静かに注ぎ入れ、10 分間おだやかに振とうします。

※18 ＴＣＡ(トリクロロ酢酸)
※19 蒸留水の洗浄はアンホラインを抜く為のものです｡ここの洗浄が不十分だとバックグランド上昇の原因になります｡（９頁データ参照）
※20 1～2日ぐらいなら、そのまま蒸留水中にゲルを保存(冷蔵～室温)できます。それ以上(～３ヶ月)の場合はゲルをラップに包んで冷凍保存 します。使用時は自然解凍します。
※21 50mM Tris-HCl pH6.8、2%SDS、0.01%BPB

③

ゲルの取り出し
カラムを傾けると自然に落ちてきますが、 出にくい場合はゴムキャップやマイクロピペットなどを利用し空気で押し出します。

ゲルは優しく扱ってね！

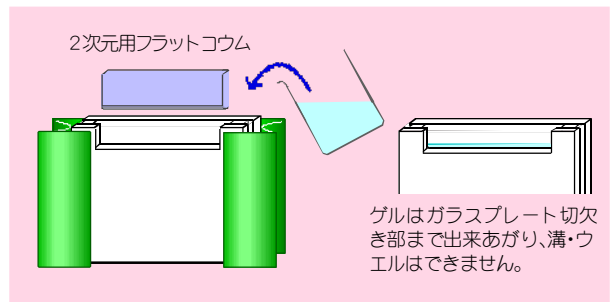
④～⑥

固定液：3分間
↓
蒸留水：1分間×3回
↓
蒸留水： １２０分間（充分に）
↓　（一時保存可能）
SDS 平衡化液：10分間

実際のゲルの写真
固定後は酸によりタンパク質が白濁し、縞模様のように見えます。 1次元目の泳動結果の目安にしてください。

ゲルの作製 ２次元目（ＳＤＳ-ＰＡＧＥ）

一般的な SDS-PAGE（Laemmli 法）の為、詳細は省略します。
①以下の溶液を作製しておきます。
・30% アクリルアミド溶液(アクリルアミド＋ビスアクリルアミド)
・ トリス－塩酸 （pH8.8） 分離ゲル用
・ トリス－塩酸 （pH6.8） 濃縮ゲル用
・ 10% 過硫酸アンモニウム（ＡＰＳ） 用時調製
・TEMED
②泳動プレートをゲル作製用に組み立てておきます。
③分画分子量範囲に応じたゲル濃度※22を選択します。
④分離ゲル溶液を調製します。規定量ビーカーにとり最後に APS と TEMED を加え、ガラスプレートに流し込みます。
⑤蒸留水を重層※23し放置します。約４０分でゲル化※24します。
⑥濃縮ゲル溶液を調製します。
⑦分離ゲルの重合を確認後、蒸留水を捨て濃縮ゲル溶液でゲル上端を洗浄後､溶液を流し込みます。２次元用コウム★を置いて放置します。
約４０分でゲル化します。

※22 通常５～20%濃度(分画分子量範囲約10,000～400,000Da)が利用されます。
※23 アクリルアミドのゲル化(重合反応)は酸素(空気)によって阻害される為、 空気と遮断する目的と、ゲル上端を平らにする為に蒸留水を重層します。

ゲルはガラスプレート切欠き部まで出来あがり､溝･ウエルはできません。

★２次元用コウムはフラット です｡(溝･ウエルはありません)

※既製ゲル
「ｅ･パジェル」「ｃ･パジェル」 シリーズもあります。
袋から出してすぐに使用できます。

「ｅ･パジェル」
価格13,800円

「ｃ･パジェル」
価格15,000円/17,000円

電気泳動 ２次元目（ＳＤＳ-ＰＡＧＥ）

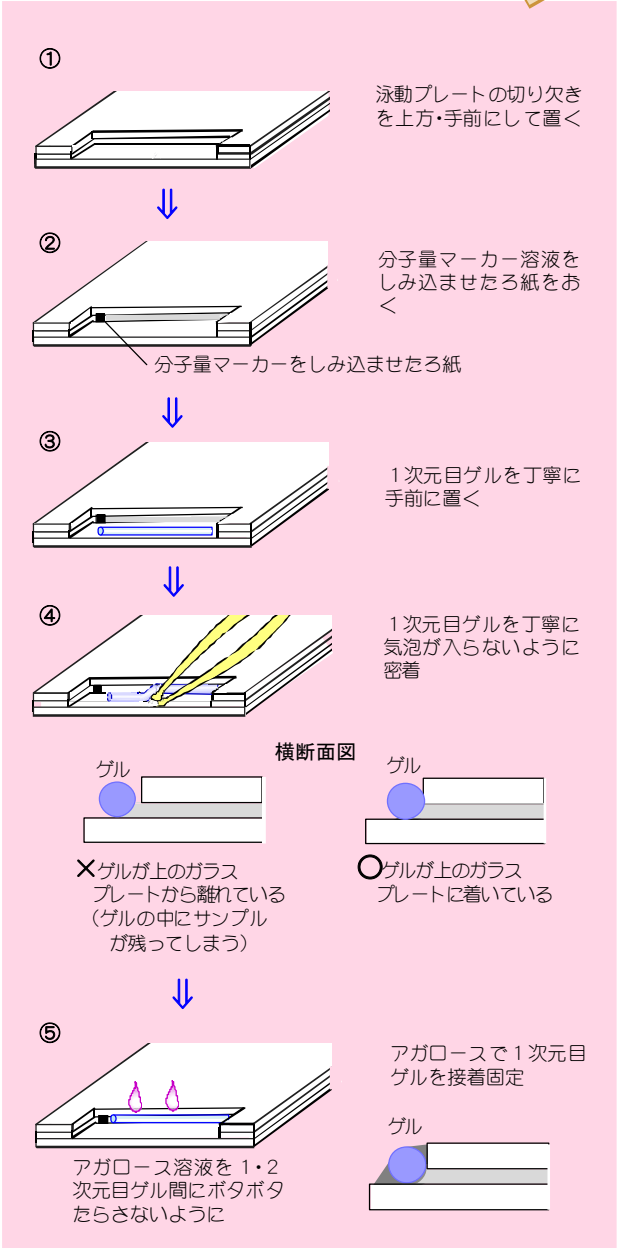
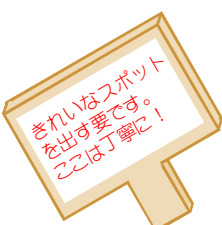
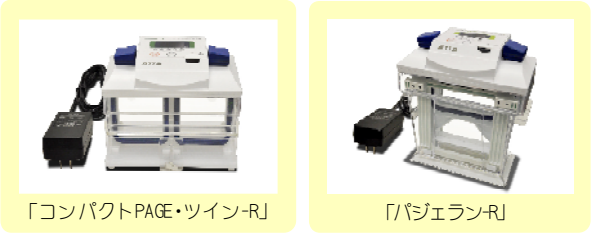
●１次元目ゲルのアプライ

①泳動プレート（２次元目ゲル）を切り欠きを上方・手前にして置きます。
②分子量マーカー（溶液）をアプライする場合は、3mm四方に切断した清潔なろ紙に分子量マーカー溶液をしみ込ませ、ピンセットでゲル上端の端に置きます。溶液量が多い場合はろ紙を２枚重ねます。
③SDS平衡化した1次元目ゲルを破損させないように泳動プレートの切り欠きの手前に置きます。
④１次元目ゲルを端から少しずつ丁寧に２次元目ゲル上端に気泡や溶液を入れないように密着させます。
⑤1次元目ゲル接着用アガロース溶液※25を加熱溶解し、1次元目ゲル上端～２次元目ゲルとの接触部分、およびろ紙と2次元目ゲルの接触部分に合計100μL滴下し、両者を接着します。

※１次元目ゲルと２次元目ゲルの密着が悪いとスポットが横に広がった形になります。アガロースは１次元目ゲルトップに垂らし自然に広がるように。また気泡もパターンの乱れの要因になります。ここは慎重、丁寧に！
※25 1%アガロース（電気泳動用の一般的なもの）／SDS-PAGE泳動バッファーを加熱溶解し1mLずつ分注しておきます。

●2次元目の泳動

⑥予め２次元目用（スラブ）電気泳動装置の下部泳動槽に泳動バッファー※26を入れておきます。
⑦１次元目ゲルをアプライした泳動プレート（ゲル）を上部泳動槽にセットします。
⑧泳動プレートをセットした上部泳動槽を下部泳動槽に入れます。
⑨上部槽に泳動バッファーを適当量まで入れます。電源部を接続または安全カバーをしてリード線と電源と接続します。
⑩泳動装置の仕様に従って通電条件を設定し開始します。
⑪BPBがゲル先端より手前３～５mmまで移動したら通電を停止します。コンパクトPAGE（・ツイン-R）で約３５分、パジェラン（-R）、ラピダス・ミニスラブで８０～８５分で泳動は終了します。

※泳動装置へのセッティングおよび通電条件等は装置によって異なります。装置付属の取扱説明書をご参照のうえ指示に従ってください。
※26 25mMトリス、192mMグリシン、0.1%SDS
AE-1410「EzRun」イージーラン　泳動用バッファー

通電条件

泳動装置	設定（モード）	通電時間
コンパクトPAGE	Trs-Gly./PAGEL High	35min
コンパクトPAGE・ツイン(-R)	Trs-Gly./PAGEL	
パジェラン(-R)	定電流20mA（ゲル1枚）	80～85min
ラピダス・ミニスラブ(-R)	定電流40～42mA（ゲル2枚）	

※通電時間は目安です。

ゲルの染色

●CBB染色（クマシーブリリアントブルー染色）

①ゲルよりやや大きめのトレイ※27を準備し、脱色液を入れておきます。
②ガラスプレートからゲルを取出し、脱色液に沈めて振とう(タンパク質を固定)します。※28
③脱色液を破棄しＣＢＢ染色液で振とうします。
④染色液を破棄し脱色液で振とうします。バックグランドが若干残っている状態で終了します。

ＣＢＢ染色
固定(脱色液)：10～20分間
↓
染色(染色液)：20～40分間
↓
脱色(脱色液)：30～60分間

※27トレイはゲルより１～数cm大きく、ゲルが溶液に充分沈む深さのものを選びます。フタもあると便利です。市販のタッパーウエアでも充分です。
※28固定すると染色・脱色が短時間ですみます。
振とうはゲル全体をムラ無く染脱色するためのものです。ゲルが１箇所　に留まらない程度の振りで充分です。

●銀染色、蛍光染色、ネガティブ染色

各染色のプロトコール(文献、取扱説明書)に従ってください。

※銀染色キット
「*EzStainSilver* イージーステイン･シルバー」
質量分析の際に不適当なグルタルアルデヒドを含みません。

「*EzStain Silver*」
価格16,000円

※ＣＢＢ染色溶液
「*EzStainAQua* イージーステイン･アクア」
アルコール、酢酸を使用しません。

「*EzStain AQua*」
価格9,800円

撮影・解析

２次元電気泳動パターンを検出したら､パターンを記録に残します。パターンの記録にはゲル撮影装置（アトー「プリントグラフ」シリーズなど）や透過光源を装備したフラットベッドスキャナ、デジタルカメラなどを利用します。保存した画像を使って何をするのかを考えて撮影する機器を選択すると良いでしょう。

使用目的①：「スポットの濃度定量をする」
推奨機器：アトー「プリントグラフ」シリーズ
メリット：プリントグラフは透過光源を用いて濃度定量に最適な、定量性の高い画像データを取得できます。
デメリット：画素数の問題により、微細なスポットが解像できない場合があります。

使用目的②：「論文掲載用などにきれいな画像を取得する」
推奨機器：フラットベッドスキャナ
メリット：スキャナは解像度が高く、また画像の収差が少ないのできれいな画像を取得するのに適しています。
デメリット：取り込み時に自動的に画像補正されることが多いため、低濃度のバンドの定量性が悪くなることがあります。

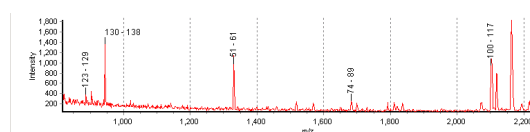
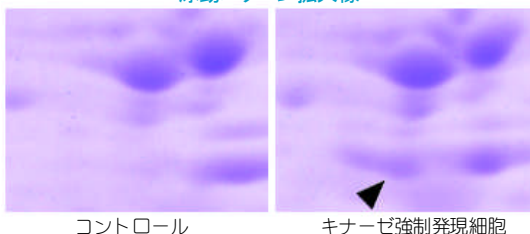
使用目的③：「泳動結果の記録・保存のみ」
推奨機器：デジタルカメラ
メリット：高画素タイプは解像度も高く、汎用的に使用することが可能です。
デメリット：定量性が低いため、濃度定量をしたい場合には不向きです。スポットの濃さが濃淡入り混じっているパターンの撮影には向きません。

特定のスポットの成分を解析する方法は①濃度定量②等電点・分子量計測③質量分析(MS)などがあります。

①**濃度定量**：染色の度合いを光源の吸収率（吸光度）から数値化します。画像解析ソフトウエアを用います。目的タンパク質の発現量を数値化し、条件の違うサンプル同士を比較します。

②**等電点・分子量計測**：等電点および分子量マーカーのゲル上の位置情報を元に、Ｘ座標軸方向にpHを、Ｙ座標軸方向に分子量をキャリブレーションします。目的のスポットの座標（X，Y）から、それぞれのキャリブレーションカーブを使って等電点および分子量を推定します。通常、画像解析ソフトウエアを用います。等電点･分子量というタンパク質の物理的な特徴を数値化します。

③**質量分析(MS)**：染色したスポットを切り出し、質量分析装置で計測します。詳細は質量分析装置のプロトコールに従ってください。タンパク質の物理的な特徴を数値化します。

質量分析(MS)データ例

Meas. mass	Ave/Isotopic	Comp. mass	Error (Da)	Res. start	Res. end	M. cut	Peptide sequence
886.365	Mono	886.400	-0.0349	123	129	0	MYSYPAR
942.519	Mono	942.566	-0.0471	130	138	0	VPPPPPIAR
1328.652	Mono	1328.648	0.0045	51	61	0	GFAFVQYVNER
1681.839	Mono	1681.905	-0.0663	74	89	0	MIAGQVLDINLAAEPK
2100.728	Mono	2100.870	-0.1421	100	117	0	SAAEMYGSSFDLDYDFQR

泳動装置：２Ｄコンパクトシステム　(1D：pH5～8、2D：12. 5%)
試料：ヒト胎児腎培養細胞(293)(添加量40μg)
結果：*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C*と同定
データ提供:東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞プロテオーム解析室

「E-グラフ」
（ﾌﾗｯﾄﾋﾞｭｱ､ﾌｨﾙﾀｰ付）
＊ﾊﾟｿｺﾝはｵﾌﾟｼｮﾝです

トラブルシューティング

泳動結果（パターン）で、発生し易い問題とその対応例です。ご参考ください。

●1次元目のバンドがシャープにならない
2次元目のスポットが横に広がったようになる

①タンパク質の還元が不充分

還元剤はメルカプトエタノールではなくDTTを使用します。また溶解したDTTは－20℃で保存しても１週間を過ぎると劣化し還元力が低下します。

②タンパク質のチオール基の修飾が不充分

サンプル溶解液にアクリルアミドまたはヨードアセトアミドを加えてチオール基を修飾しジスルフィド結合の再構築を防ぎます。 この時pHが8.8～9.0付近をはずれると修飾効率が低下します。

③タンパク質の分解・劣化

サンプル調製を氷上で行なったり、サンプル溶解液にプロテアーゼインヒビターを加えるなどして分解を防ぎます。タンパク質を溶解したサンプル溶解液は－80℃で保存し、凍結融解の繰返しは避け、2週間以内に使用します。

④脂肪や不溶物の混入

タンパク質を溶解したサンプル溶解液を充分遠心し、脂肪や不溶物を分離除去します。

⑤サンプルのオーバーロード

コンパクトゲルサイズ（50mmゲル長）で100μg以下、ミニゲルサイズ（75mmゲル長）で200μg以下にします。

⑥１次元目アガロースゲルの不出来

アガロースゲルを作製した場合、アガロースIEF粉末が完全に溶解していないとシャープなバンドになりません。ゲル中に気泡がある、ゲルが乾燥して収縮している等の場合も含めて、アガロースゲルを作製し直します。

⑦泳動(通電)不足

定電圧300Vでコンパクトゲルサイズ（50mmゲル長）で150分、ミニゲルサイズ（75mmゲル長）で210分通電します。

⑧１次元目ゲルの２次元目ゲルへの接着不良

１次元目ゲルを２次元目ゲル上端にのせる際に隙間が生じるとタンパク質が拡散し、スポットが横に広がったようになります。２次元目ゲル上端に接着用アガロース溶液を均一に引き、１次元目ゲルを気泡が入らない様に端から丁寧に密着させていきます。

⑨ジスルフィド結合の再構築など

市販の「抗ストリーキング剤」も効果があるようです。

●スポットが検出されない

①サンプル量が不充分（特にＣＢＢ染色の場合）

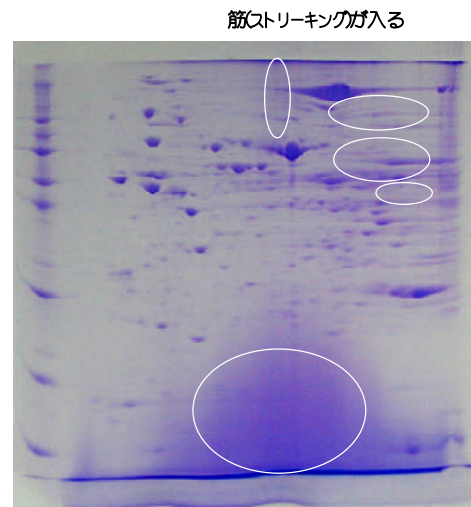
分子量マーカーのバンドが見えてサンプルスポットが見えない場合にはサンプル量が不充分な場合もあります。ＣＢＢの場合には高感度の銀染色で検出しなおしてみましょう。タンパク質量が測れない場合には、予備実験としてサンプルの希釈系列を作製して(ＳＤＳ-)ＰＡＧＥを実施してみてください。

②１次元目がうまくいかなかった

１次元目ゲルの固定後の縞模様が見えなかったり、スポットが全体にバラけていない場合、１次元目の電気泳動がうまくいかなかった可能性があります。

③検出がうまくいかなかった（マーカーも見えない場合）

銀染色やブロッティング後の検出などでは、検出がうまくいかずスポットが見えない場合も考えられます。内部標準的な分子量マーカー等を必ず一緒に泳動しましょう。

●発生し易い問題　実際のデータ例

筋(ストリーキング)が入る

バックグランドが高い

筋(ストリーキング)が入る

試料の調製（溶解、ｐＨ、分解、-S-S-再構築etc）、１次元目の泳動、２次元目へのアプライ(接着)がうまくいっていないのが原因と考えられます。

特に横筋(ストリーキング)については、１次元目の泳動(試料調製を含む)か、２次元目へのアプライ(接着)がうまくいっていないのが原因と考えられます。１次元目の泳動の良し悪しは、１次元目泳動固定後の白濁パターンで確認しましょう。(６頁参照)もし縞模様が見えない場合(試料量が少ない場合を除く)は試料調製、１次元目電気泳動の項の注意点を再確認してください。特に塩基性側が目立ったり再現性がある場合には試料調製の項を再確認してください。

バックグランドが高い

１次元目の泳動･固定後の水洗いが不充分だとアンフォライトがゲル中に残り低分子領域のバックグランドを上げる原因になります。

●2次元目のスポットがきれいにならない
スポットが縦に筋を引いたようになる

①タンパク質の還元が不充分

還元剤はメルカプトエタノールではなくDTTを使用します。また溶解したDTTは-20℃で保存しても１週間を過ぎると劣化し還元力が低下します。

②タンパク質のチオール基の修飾が不充分

サンプル溶解液にアクリルアミドまたはヨードアセトアミドを加えてチオール基を修飾しジスルフィド結合の再構築を防ぎます。この時pHが8.8～9.0付近でないと修飾効率が低下します。

③タンパク質の分解・劣化

サンプル調製を氷上で行なったり、サンプル溶解液にプロテアーゼインヒビターを加えるなどして分解を防ぎます。タンパク質を溶解したサンプル溶解液は-80℃で保存し、凍結融解の繰返しは避け、2週間以内に使用します。

●バックグランドが高い（特にゲル下部）

１次元目ゲルの洗浄が不充分

泳動後の１次元目ゲルを固定後蒸留水で充分に洗浄します。洗浄が不充分だとゲル中にアンフォライトが残り、２次元目泳動後のバックグランド上昇の原因になります。

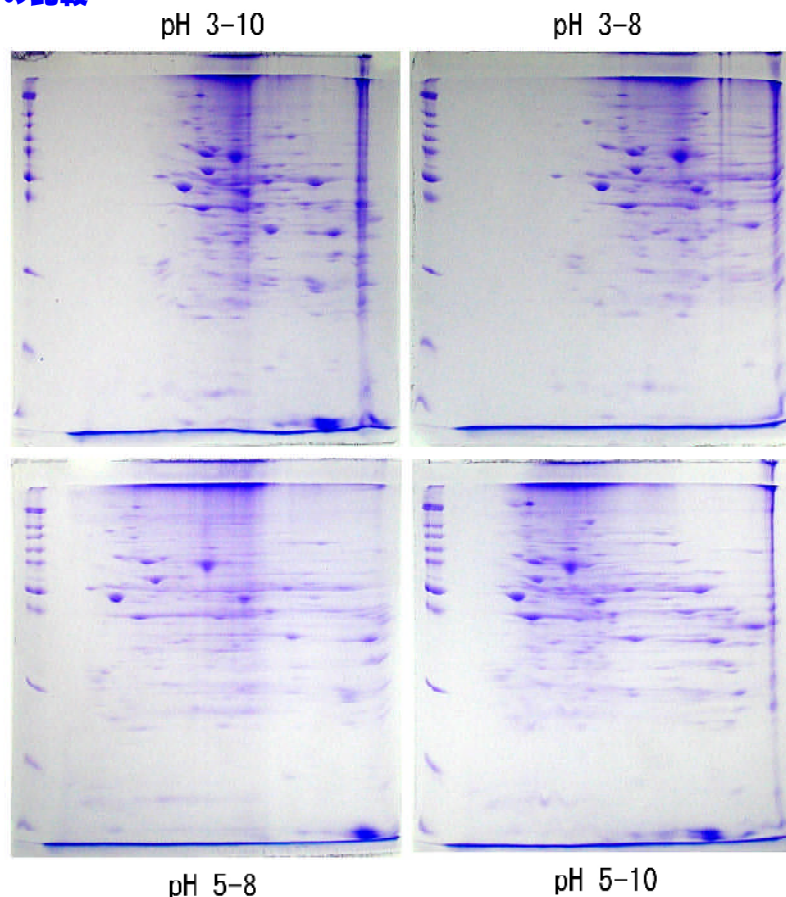
データ

＊別途「データ集」あり。ご請求ください。

１次元目(等電点電気泳動)の pH 範囲の比較

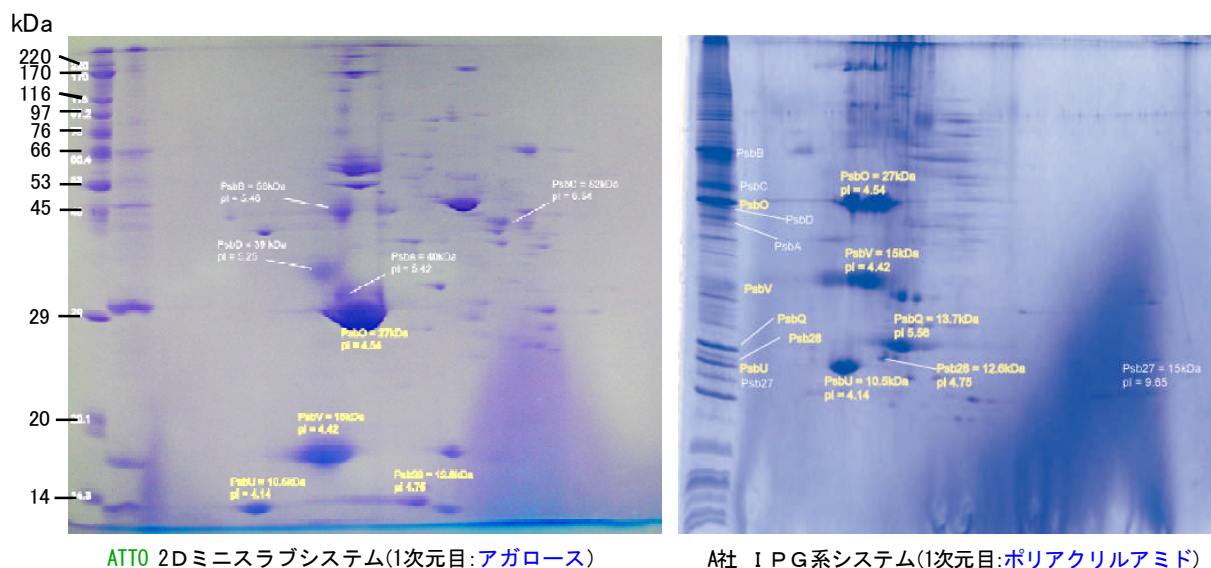
電気泳動装置:２Ｄコンパクトシステム
試料:ラット腎臓
１次元目ゲル:pHレンジ 各種、
　　　　　　アガロースゲル作製
２次元目ゲル:12.5%ポリアクリル
　　　　　　　アミドゲル作製
　　　　60×60×0.75mm
検出:ＣＢＢ染色

pH 3-10　　pH 3-8

pH 5-8　　pH 5-10

IPG ゲル(ドライストリップゲル)との比較

電気泳動装置:２Ｄミニスラブシステム
試料:チラコイド膜タンパク質　70μg (白字が膜タンパク質(疎水性タンパク質)、黄字は親水性タンパク質)
１次元目ゲル:アガーゲル(Φ2.5ｘ75mm)　pHレンジ３～１０
２次元目ゲル:12.5%ポリアクリルアミドゲル作製 90×80×１mm
検出:ＣＢＢ染色

ATTO ２Ｄミニスラブシステム(1次元目:アガロース)

A社　ＩＰＧ系システム(1次元目:ポリアクリルアミド)

IPG系システムでは検出できなかった膜タンパク質(白字)がアトーの2Dミニスラブシステムでは検出されています

資料についてのお問合せは・・・

アトー株式会社 顧客部顧客サポートグループ
TEL 03-5827-4861 Fax 03-5827-6647
E-mail info@atto.co.jp
〒111-0041 台東区元浅草3-2-2

ATTO

2D電気泳動のコツ

「コンパクト／ミニ
アガロースゲル２次元電気泳動」

2012/8/1